

ORIGINAL

Cytoprotective effect of allium sativum (garlic) and alkaline water on β -pancreatic cells as a preventive treatment for diabetes induced in wistar rats

Efecto citoprotector de allium sativum (ajo) y agua alcalina en las células β pancreáticas como tratamiento preventivo de diabetes inducida en ratas wistar

Alexandra López Barrera¹  , Alondra Idrovo Encalada¹  , Zoraida Burbano Gómez¹  , Francisca Patricia Jimenez Granizo¹  , Pilar Asunción Soledispa Cañarte¹  , Glenda Marcela Sarmiento Tomalá¹  , Francisca Patricia Jimenez Granizoo¹  

¹Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas. Guayaquil, Ecuador.

Citar como: López Barrera A, Encalada AI, Burbano Gómez Z, Jimenez Granizo FP, Soledispa Cañarte PA, Sarmiento Tomalá GM, et al. Cytoprotective effect of allium sativum (garlic) and alkaline water on β -pancreatic cells as a preventive treatment for diabetes induced in wistar rats. Health Leadership and Quality of Life. 2022; 1:38. <https://doi.org/10.56294/hl202238>

Enviado: 21-07-2022

Revisado: 06-10-2022

Aceptado: 01-12-2022

Publicado: 02-12-2022

Editor: PhD. Prof. Neela Satheesh 

Autor para la correspondencia: Alexandra López Barrera 

ABSTRACT

Allium sativum and alkaline water have an antioxidant effect, capable of protecting any cell from degeneration. Studies have shown that they regulate glucose levels; however, there is no evidence of research on the mixture of both treatments with histopathological studies. The objective of the present study was to evaluate the cytoprotective effect of the joint administration of Allium sativum and Alkaline Water in different doses and periods of time. For this research, 8 groups of 12 animals each were formed, to which initial glucose was measured, and then the corresponding treatments were administered for 7, 14 and 21 days. Control group A without treatment, group B induction with alloxan, group C positive control administered: Glibenclamide, Group D Allium sativum oil, Group E alkaline water and Groups F, G, and H received Allium sativum and Alkaline water together at different doses. After each time period diabetes was induced using alloxan, final glucose was measured and the pancreas was extracted for subsequent histopathological analysis. The results obtained were analyzed by comparison of means, observing that from 7 days of treatment, both Allium sativum and alkaline water separately, as well as the joint administration of both, prevented the increase of glucose values. Histopathological analysis showed that Allium sativum had a cytoprotective effect at 21 days of treatment; on the other hand, at 21 days of treatment with alkaline water, a minimal cytoprotective effect was observed; while experimental animals treated with both treatments at different doses showed a cytoprotective effect from day 7 of treatment. Concluding that the joint administration of Allium sativum and alkaline water has an effective cytoprotective and normoglycemic effect.

Keywords: Allium Sativum; Alkaline Water; Cytoprotective Effect; Glucose; Histopathological.

RESUMEN

El Allium sativum y el Agua Alcalina poseen efecto antioxidante, capaces de proteger cualquier célula de una degeneración. Estudios realizados demuestran que regulan los niveles de glucosa; sin embargo no hay evidencias de investigaciones sobre la mezcla de ambos tratamientos con estudios histopatológicos. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto citoprotector de la administración conjunta de Allium sativum y el Agua Alcalina en diferentes dosis y períodos de tiempo. Para esta investigación se formaron 8 grupos de 12 animales cada uno, a los que se midió glucosa inicial, y luego se les administraron los tratamientos correspondientes durante 7, 14 y 21 días. El grupo control A sin tratamiento, grupo B inducción con aloxano, grupo C control positivo administrado: Glibenclamida, el Grupo D aceite de Allium

sativum, Grupo E agua alcalina y los Grupos F, G, y H recibieron Allium sativum y Agua Alcalina en conjunto a diferentes dosis. Luego de cada período de tiempo se indujo la diabetes usando aloxano, se midió glucosa final y se extrajo el páncreas para posterior análisis histopatológico. Los resultados obtenidos fueron analizados por comparación de medias, observándose que desde los 7 días de tratamiento tanto el Allium sativum y Agua Alcalina por separado, como la administración conjunta de ambos, impidió el incremento de los valores de glucosa. En tanto los análisis histopatológicos evidenciaron que el Allium sativum tuvo un efecto citoprotector a los 21 días de tratamiento; por otro lado a los 21 días de tratamiento con Agua Alcalina se presenciaba un efecto citoprotector mínimo; en tanto los animales de experimentación tratados con ambos tratamientos a diferentes dosis, mostraron un efecto citoprotector desde el día 7 de tratamiento. Concluyendo que la administración conjunta de Allium sativum y Agua Alcalina tiene efecto citoprotector y normoglucemiante efectivo.

Palabras clave: Allium Sativum; Agua Alcalina; Efecto Citoprotector; Glucosa; Histopatológico.

INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada ya sea por la degeneración de las células B pancreáticas o por resistencia a la insulina segregada por las mismas, siendo el resultado de estas condiciones un aumento de glucosa en la sangre, lo cual desencadena numerosas enfermedades.⁽¹⁾ La incidencia de diabetes en el mundo es cada vez mayor, alcanzando cifras alarmantes, de tal manera que se hace necesaria la búsqueda de hábitos o tratamientos que puedan prevenir el desarrollo de esta enfermedad.⁽²⁾

En investigaciones sobre el efecto histopatológico y bioquímico de aceite de Allium sativum en ratas con diabetes tipo 1, el aceite de Allium sativum fue capaz de normalizar los niveles de glucosa en la sangre en ratas con diabetes tipo 1 con un incremento en la producción de insulina debido a la regeneración histológica del tejido pancreático dañado que se produjo en el proceso de la enfermedad.⁽³⁾ Por otro lado, un estudio del efecto preservativo del agua electrolizada reducida sobre las células B pancreáticas en ratones diabéticos, probó que el agua electrolizada produjo un aumento de la secreción de insulina y la sensibilidad a la insulina, lo que llevó a una disminución de la hiperglucemia y una reducción del desarrollo de la diabetes.⁽⁴⁾

Si bien existen antecedentes que el Allium sativum y el Agua Alcalina podrían usarse como tratamientos en procesos diabéticos, esta investigación se propone un tratamiento para prevenir el desarrollo de esta enfermedad crónica, buscando un efecto normoglucemiante y citoprotector mediante la administración conjunta de Allium sativum y el Agua Alcalina en diferentes dosis y realizando mediciones a diferentes intervalos de tiempo (7, 14 y 21 días), analizando si es que el sinergismo va a depender de la dosis y el factor tiempo.^(5,6)

¿La administración de la mezcla de Allium sativum y Agua Alcalina presentará propiedades citoprotectoras en células B pancreáticas de los animales de experimentación como tratamiento preventivo en diabetes inducida?

Objetivos

Evaluar el efecto citoprotector de Allium sativum y Agua Alcalina en las células B pancreáticas como tratamiento preventivo en ratas Wistar con diabetes inducida.

MÉTODO

Métodos Teóricos

Por las características de este proyecto se usó el método Hipotético - Deductivo, ya que se busca la aseverar o refutar la hipótesis planteada.

Métodos Empíricos

Los métodos empíricos usados para esta investigación fueron los de observación y experimentación.

Se realizó una observación mediante la búsqueda de antecedentes para luego plantear la hipótesis. Luego se realizó la respectiva experimentación para así comprobar la hipótesis planteada.

Métodos Matemáticos o Estadísticos

Se utilizó el método estadístico análisis de variación de medias; ya que esto sirvió de soporte para el análisis de los resultados y discusión, a partir de los cuales se determinaron las conclusiones.

Conformación de Grupos de Trabajo y Aclimatización: se usaron ratas Wistar machos con un peso promedio de $200 \text{ g} \pm 20\%$, los cuales fueron provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas. Los animales de experimentación fueron seleccionados de forma aleatoria para la formación de los ocho grupos de 12 animales de experimentación.



Figura 1. Metodología

Las condiciones en las que se mantuvieron a los animales fueron de 22 - 25 °C de temperatura y un fotoperiodo de 12:12 (luz/oscuridad).

Durante el tiempo de prueba los animales sujetos de estudio permanecieron en jaulas plásticas con tapas metálicas que contenían el alimento y agua de consumo, los mismos que fueron suministrados de forma adlíbitum.

Determinación de Glucosa Inicial: se procedió a determinar los valores iniciales de glucosa en cada uno de los animales, para ello se retiró el alimento 12 horas antes de la extracción de sangre.

Para la realización de este procedimiento se anestesió al animal colocándolo en una cabina saturada con éter etílico, aplicando los principios éticos de refinamiento de la técnica, y con la ayuda de un capilar se obtuvo la muestra sanguínea del plexo ocular, se procedió a centrifugar la muestra para así separar el plasma y usar este para realizar las determinaciones de glucosa.

Para la determinación de glucosa se utilizó el método enzimático de Wiener Lab, el cual indica que en tres tubos marcados como B (Blanco), S (Estándar) y D (Desconocido) se debe agregar reactivos o muestra según se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Esquema de cantidades de estándar, muestra y reactivo de trabajo para la determinación de glucosa mediante el método enzimático de Wiener Lab

	B	S	D
Estándar	-	20µl	-
Muestra	-		20µl
Reactivo de Trabajo	2ml	2ml	2ml

Fuente: Wiener Lab

Tabla 2. Tratamientos y dosis a los diferentes grupos de trabajo

Grupo de experimentación	Tratamientos	Inducción de diabetes	Dosis Mg/kg	Volumen ml/kg
Grupo A	Control Normal	Agua Potable	No	N/A
Grupo B	Control Negativo	Agua Potable	Si	N/A
Grupo C	Control Positivo	Glibenclamida	Si	0,05
Grupo D	Muestra 1	Allium sativum	Si	250
Grupo E	Muestra 2	Agua alcalina	Si	N/A
Grupo F	Muestra 3	Allium sativum y Agua Alcalina	Si	250
Grupo G	Muestra 4	Allium sativum y Agua Alcalina	Si	500
Grupo H	Muestra 5	Allium sativum y Agua Alcalina	Si	1000
Fuente: Chaca & Piguave				

Se incuba por 10 minutos en baño de agua a 37°C. Luego se lee en espectrofotómetro 505 nm llevando el aparato a cero con el blanco. (Wiener Lab, 2000).

Luego de la determinación de glucosa inicial se procedió a reorganizar los grupos de trabajo para empezar el experimento con un promedio igual y no exista diferencia estadística entre grupos que pueda comprometer los resultados estadísticos finales.

Fase de Tratamiento: los diversos tratamientos se administraron a los grupos de experimentación de acuerdo a lo detallado en la tabla 2.

N/A No Aplica Para la administración de este volumen se realizó un recálculo de acuerdo al peso corporal del animal y repartido durante el día en varias administraciones.

Preparación de las muestras

Aceite de *Allium sativum*

La muestra del aceite de *Allium sativum* se obtuvo a partir de cápsulas blandas de aceite de ajo, para lo cual se extrajo el aceite con la ayuda de una jeringuilla según la cantidad necesaria para la respectiva dosificación.

Agua Alcalina: se vertió agua potable en un purificador de agua Pimag Water System de Nikken para purificar y mineralizar el agua, luego esta agua se pasó a un optimizador de agua Nikken Pimag Optimizer y de aquí se obtuvo el agua alcalina que será administrada.

Glibenclamida: se trituró las tabletas de Glibenclamida hasta reducir a polvo fino, para con ello realizar una dilución en carboxi-metil celulosa 0,5 %.

Inducción de Diabetes: la diabetes fue inducida después de los 7, 14 y 21 días de tratamiento, inyectando aloxano vía intraperitoneal en dosis de 100mg/Kg. El aloxano fue recién preparado y disuelto en 0,05 M de buffer Citrato a pH 4,5 debido a la inestabilidad del mismo. La inducción de la diabetes se realizó en todos los grupos de experimentación con excepción del grupo control (Grupo A).

Determinación de Glucosa Final

Después de 72 horas de la inducción de diabetes se procedió a medir los niveles de glucosa final de 4 animales de experimentación de cada grupo. Para esto los animales de experimentación fueron sujetos a ayuna de 12 horas pero tuvieron acceso a agua potable. Se procedió a tomar la muestra de sangre para el análisis de glucosa siguiendo el procedimiento antes mencionado.

Extracción del Páncreas: luego de tomar la muestra para la determinación de glucosa final se procedió a darles eutanasia a los animales de experimentación, de acuerdo a los principios éticos 3Rs.

Comprobada la muerte del animal, se realizó la disección del mismo, se extrajo el páncreas y se lo colocó en recipientes con formol al 10 % y solución tampón durante 48 horas.

Procesamiento de las Muestras del Páncreas para el Análisis Histopatológico

Formación de Bloques de Parafina:

- Luego de que el páncreas estuvo en formol buferado por 48 horas, se realizó el corte de una sección del órgano a estudiar.
 - El corte realizado se colocó en un casete para biopsias.
 - Se procedió a enjuagar los cassetes con abundante agua potable para retirar excesos de formol.
 - Luego se colocó los cassetes en Alcohol al 70 %, Alcohol al 90 % y alcohol absoluto durante 30, 40 y 40 minutos respectivamente.
 - Despues se sumergió los cassetes en 3 diferentes frascos con Xileno durante 30, 40 y 40 minutos respectivamente.
 - Los cassetes fueron colocados en parafina líquida a 57oC durante 15 minutos, para luego ponerlos nuevamente en otro contenedor con parafina durante 15 minutos más.
 - Se realizó la inclusión en parafina colocando el tejido en una placa de acero inoxidable y añadiendo parafina líquida.
 - Se lo colocó en una placa congelante para solidificar y así formar los bloques de parafina.

Corte del Tejido:

1. Se procedió a cortar los bloques de parafina, usando un micrótomo graduado para obtener un corte de 5 µm del tejido parafinizado.
2. Se tomó con una pinza el corte en parafina y colocó en un baño para flotación de tejidos que contenía gelatina y agua a 50oC.
3. Se seleccionó los mejores cortes y se los tomó con una placa portaobjetos.

Tinción Eosina-Hematoxilina:

1. Se realizó la desparafinización del tejido colocando las placas en una gradilla en la estufa durante 2 horas.

2. Se completó la desparafinización del tejido colocando las placas en 5 recipientes con xilol durante 30 minutos en cada uno.
3. Se hidrató el tejido colocando las placas en alcohol al 100 %, 95 % y 80 % durante 20 minutos cada uno, esto se realiza para que la tinción entre fácilmente al tejido.
4. Se puso las placas en un recipiente con tinción de hematoxilina durante 4 minutos.
5. Se enjuagó con abundante agua potable hasta que el agua de lavado no presente coloración alguna.
6. Se procedió a sumergir las placas en alcohol ácido para retirar el exceso de hematoxilina.
7. Luego se colocó las placas en alcohol al 80 %.
8. Se sumergió las placas en la tinción de eosina durante 4 minutos.
9. Las placas se enjuagaron, 2 veces en alcohol al 95 % y otras dos con alcohol al 100 %.
10. Se dejó secar las placas al ambiente.
11. Se colocó las placas en Xileno durante 15 minutos.
12. Se realizó el montaje de las placas, humedeciendo la placa con xileno y agregando 3 gotas de entellan a la placa, luego se colocó la laminilla cubreobjetos y se dejó secar.

Análisis Histopatológico

Se procedió a observar al microscopio las diferentes placas con aumentos de 10x y 40x; diferenciando los Islotes de Langerhans, las Células B Pancreáticas, la arquitectura pancreática y determinando si hubo la presencia de indicadores de inflamación que demuestren necrosis celular.

Tipo de investigación: la presente investigación es exploratoria, debido a que, si bien hay antecedentes con respecto al efecto de los principios activos estudiados, el tema de investigación planteado no ha sido estudiado antes.

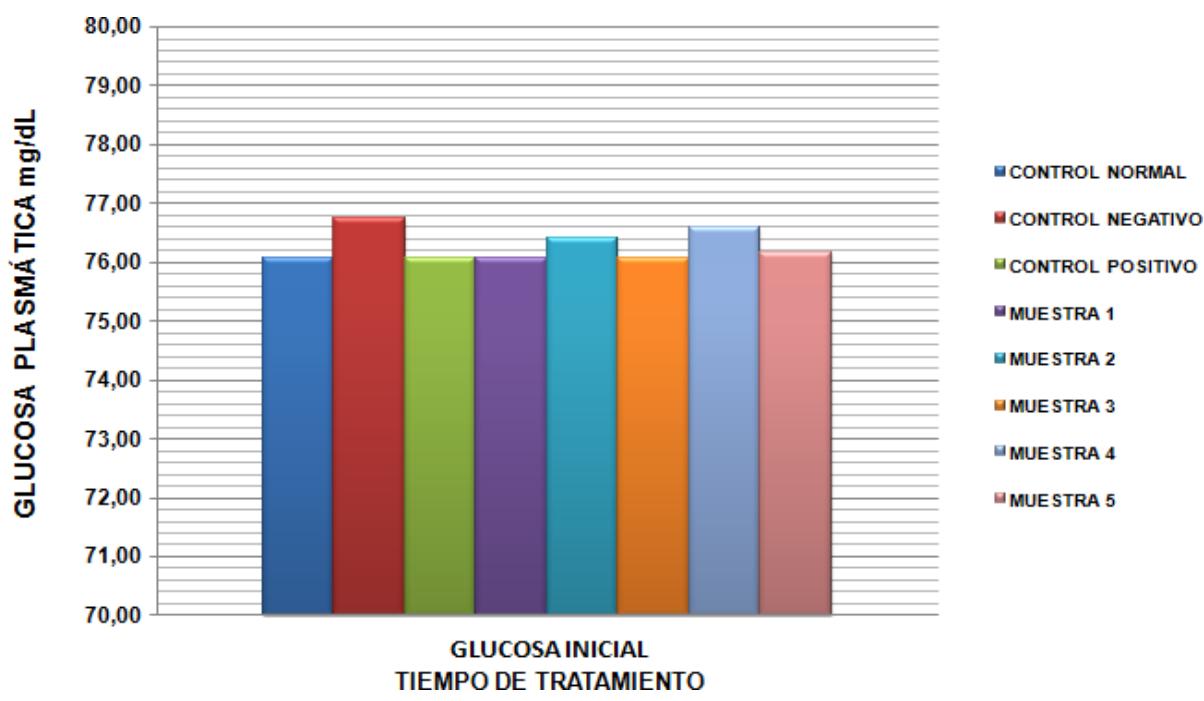
Diseño experimental de la investigación: el diseño experimental del presente estudio fue un diseño experimental verdadero, ya que hubo la manipulación intencional de las variables independientes como lo son las dosis y el tiempo de administración de los diferentes tratamientos.

El diseño experimental verdadero a su vez, fue un diseño con medición previa y posterior con grupo control, ya que se realizaron mediciones de glucosa antes y después del tratamiento, encontrándose todos los grupos de trabajo bajo las mismas condiciones durante todo el estudio.

Por otro lado, el diseño experimental verdadero usado también fue un diseño experimental de series cronológicas, debido a que el tiempo de tratamiento es una variable independiente en este proyecto investigativo, dándose las mediciones de glucosa y los análisis histopatológicos del páncreas en diferentes intervalos de tiempo (7, 14 y 21 días de tratamiento).

RESULTADOS

Análisis e interpretación de los resultados, resultados de la experimentación y resultados glucosa plasmática.



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 2. Glucosa Plasmática Inicial (mg/dL) de los Diferentes Grupos de Experimentación Antes de Iniciar el Tratamiento

Previa reorganización de los animales de experimentación de los diferentes grupos para obtener un promedio igual, el análisis de comparación de medias demostró que no exista diferencia estadística entre grupos.

Tabla 3. Promedio Niveles de Glucosa Final de los Grupos de Tratamiento después de 7 Días de Tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

Grupo	Promedio*	Comparación De medias
Control normal	100,00	A
Control negativo	261	B
Control positivo (glibenclamida)	112,00	A
Muestra 1 (<i>allium sativum</i>)	92,00	A
Muestra 2 (agua alcalina)	111,25	A
Muestra 3 (<i>allium sativum</i> 250mg/kg + agua alcalina 20ml/kg)	92,25	A
Muestra 4 (<i>allium sativum</i> 500mg/kg + agua alcalina 10ml/kg)	103,50	A
Muestra 5 (<i>allium sativum</i> 1000mg/kg + agua alcalina 5ml/kg)	93,75	A

Fuente: Chaca & Piguave

Nota: grupos con letras iguales en comparación de medias no poseen diferencia significativa entre sí. *p<0,05

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente en lo que se pudo demostrar que después de 7 días de tratamiento todos los grupos difieren del grupo B control negativo (sin tratamiento). Es decir, tanto los grupos tratados con *Allium sativum* y Agua Alcalina de forma independiente así como las mezclas consiguieron regular los niveles de glucosa en comparación al grupo control negativo; lo que se puede observar en la tabla 3.

Tabla 4. Promedio Niveles de Glucosa Final de los Grupos de Tratamiento después de 14 Días de Tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

Grupo	Promedio*	Comparación De medias
Control normal	77,75	Cd
Control negativo	259,00	B
Control positivo (glibenclamida)	93,50	Ac
Muestra 1 (<i>allium sativum</i>)	107,00	A
Muestra 2 (agua alcalina)	108,75	A
Muestra 3 (<i>allium sativum</i> 250mg/kg + agua alcalina 20ml/kg)	103,75	A
Muestra 4 (<i>allium sativum</i> 500mg/kg + agua alcalina 10ml/kg)	70,00	Cd
Muestra 5 (<i>allium sativum</i> 1000mg/kg + agua alcalina 5ml/kg)	66,75	D

Fuente: Chaca & Piguave

Nota: grupos con letras iguales en comparación de medias no poseen diferencia significativa entre sí. *p<0,05.

El análisis estadístico de los datos obtenidos demostró que después de la administración de 14 días de tratamiento todos los grupos presentaron diferencias estadísticas entre el grupo con control negativo sin tratamiento. Observándose que la muestra 5 redujo significativamente los valores de glucosa, pudiendo compararse con el control normal y la muestra 4. En tanto que aquellos animales que recibieron Glibenclamida tuvieron una proximidad a las muestra 1, muestra 2, muestra 3 y muestra 4; demostrándose con este análisis que a este periodo de administración (14 días) la mezcla muestra 5 consiguió mantener los niveles de glucosa en rangos normales (tabla 4).

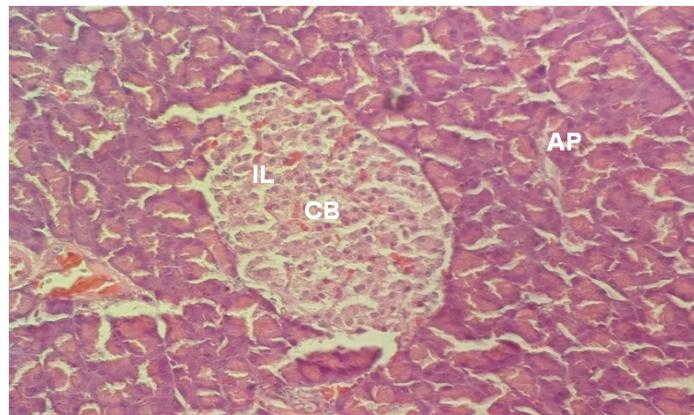
Tabla 5. Promedio Niveles de Glucosa Final de los Grupos de Tratamiento después de 21 Días de Tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

Grupo	Promedio*	Comparación De medias
Control normal	104,00	A
Control negativo	273,50	B
Control positivo (glibenclamida)	84,00	A
MUESTRA 1 (<i>Allium sativum</i>)	95,75	A
Muestra 2 (agua alcalina)	95,25	A
Muestra 3 (<i>allium sativum</i> 250mg/kg + agua alcalina 20ml/kg)	88,75	A
Muestra 4 (<i>allium sativum</i> 500mg/kg + agua alcalina 10ml/kg)	98,25	A
Muestra 5 (<i>allium sativum</i> 1000mg/kg + agua alcalina 5ml/kg)	91,50	A

Fuente: Chaca & Piguave

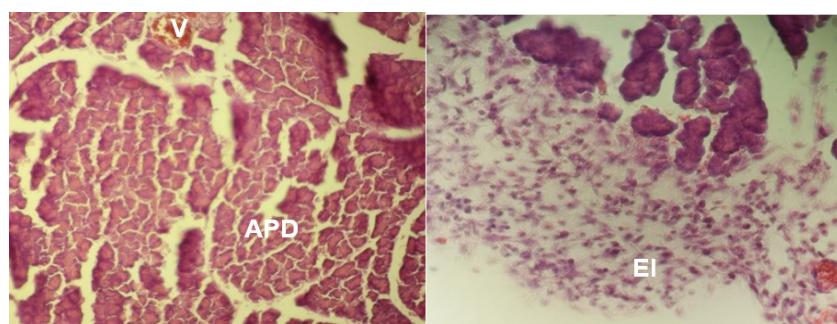
Nota: Grupos con letras iguales en comparación de medias no poseen diferencia significativa entre sí.*p<0,05.

Como se muestra en la tabla 5, el análisis estadístico de los niveles de glucosa después de 21 días de tratamiento evidenció que todos los grupos difieren del grupo B control negativo sin tratamiento. Lo que se traduce a que, tanto los grupos tratados con *Allium sativum* y Agua Alcalina de forma independiente así como las mezclas consiguieron regular los niveles de glucosa en comparación al grupo control negativo, pudiendo establecer que los valores de glucosa fueron estadísticamente iguales a los obtenidos a los 7 días de experimentación.



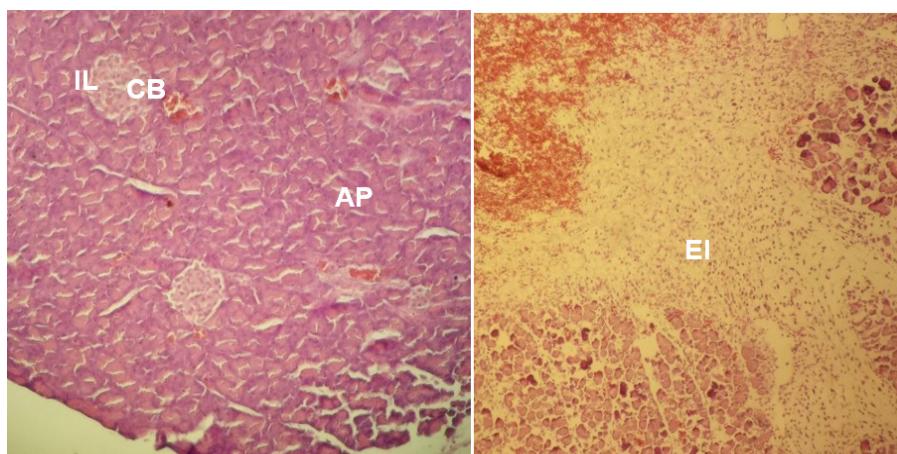
Fuente: Chaca & Piguave
Figura 3. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Control Normal

Para que un páncreas pueda ser considerado sano, se observan las células β pancreáticas (CB) en gran número dentro del Islote de Langerhans (IL), así como también los acinos pancreáticos (AP) con una arquitectura celular normal (figura 2).



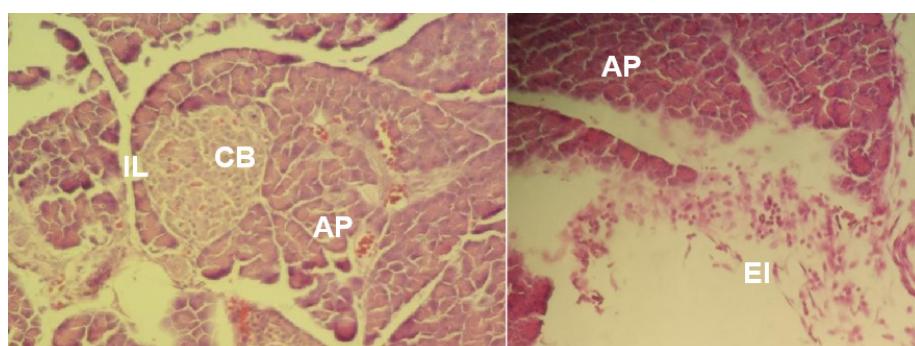
Fuente: Chaca & Piguave
Figura 4. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Control Negativo

En el caso de un páncreas enfermo (figura 3), se observan los acinos pancreáticos degenerados (APD), así mismo se aprecia la presencia de elementos inflamatorios (EI) en abundancia, que son signo de una necrosis. También se evidencia vascularización, que es la acumulación excesiva de glóbulos rojos en los vasos sanguíneos del páncreas, lo cual provoca la circulación lenta y por ende complicaciones diabéticas. No se pudo observar la presencia de Islotes de Langerhans o células B Pancreáticas.



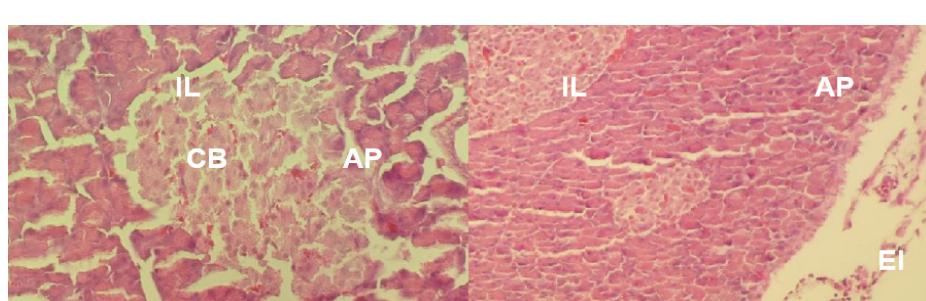
Fuente: Chaca & Piguave
Figura 5. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Control Positivo

Durante los 7, 14 y 21 se pudo apreciar la presencia de los Islotes de Langerhans (IL) pero si se observan las células B pancreáticas (CB), también se pueden observar los acinos pancreáticos (AP) con una arquitectura celular normal. Por otro lado también se pudo notar la presencia de elementos inflamatorios (EI) en abundancia lo que podría indicar que en el páncreas empezó un proceso de necrosis (figura 4).



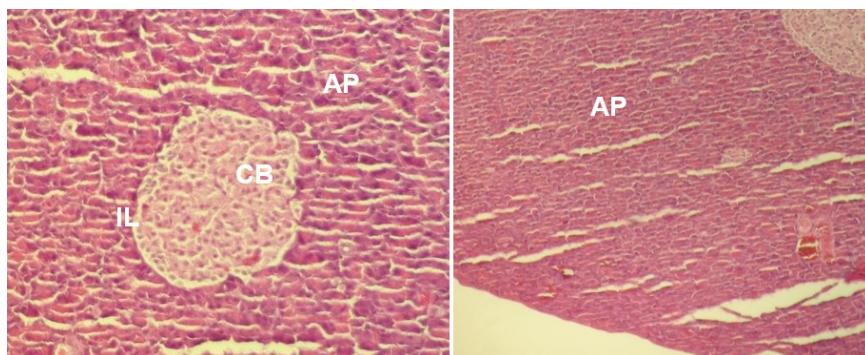
Fuente: Chaca & Piguave
Figura 6. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 1 después de 7 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

Los animales de experimentación tratados con la muestra 1 (*Allium sativum*) a los 7 días de tratamiento presentaron una preservación casi completa de la arquitectura celular de los acinos pancreáticos (AP), los islotes de Langerhans (IL) presentaban un tamaño reducido pero las células B pancreáticas (CB) se presentaron normales, también hubo presencia de elementos inflamatorios (EI) (figura 5).



Fuente: Chaca & Piguave
Figura 7. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 1 después de 14 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

Los animales tratados con la muestra 1 (*Allium sativum*) a los 14 días de tratamiento presentaron una preservación de la arquitectura celular completa de los acinos pancreáticos (AP), los islotes de Langerhans (IL) presentaban un tamaño normal pero las células β pancreáticas (CB) se presentaron normales y casi no hubo presencia de elementos inflamatorios (EI) (figura 6).



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 8. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 1 después de 21 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

A los 21 días de tratamiento con la muestra 1 (*Allium sativum*), los páncreas de los animales de experimentación presentaron observar las células β pancreáticas (CB) en gran número dentro del Islete de Langerhans (IL), así como también los acinos pancreáticos (AP) con una arquitectura celular completamente normal (figura 7).

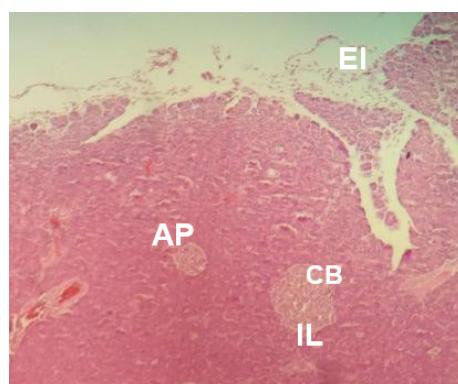
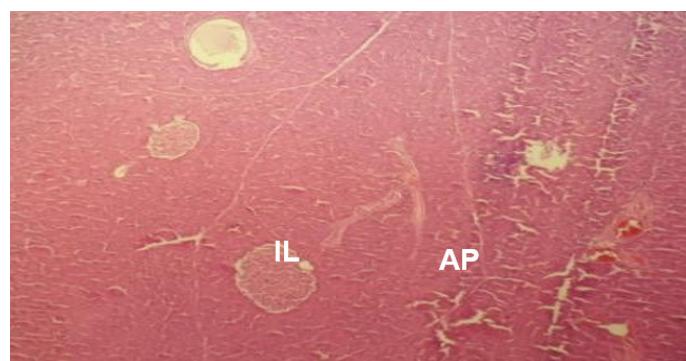


Figura 9. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 2 después de 7 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

Fuente: Chaca & Piguave

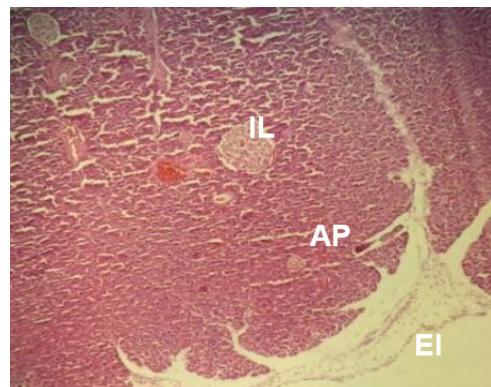
En el caso de los animales de experimentación tratados con la muestra 2 (agua alcalina) a los 7 días presentaron elementos inflamatorios, reducción del tamaño de los islotes pancreáticos pero con células β pancreáticas intactas y una conservación parcial de los acinos pancreáticos (figura 8).



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 10. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 2 después de 14 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

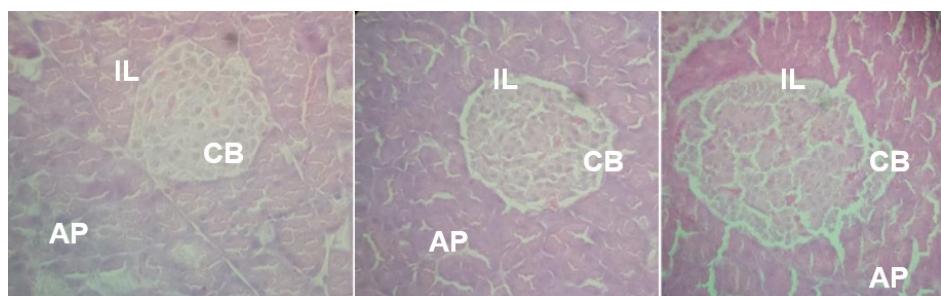
Los animales de experimentación tratados con la muestra 2 (agua alcalina) a los 14 días presentaron elementos inflamatorios, una reducción del tamaño de los islotes pancreáticos y una conservación mejor de los acinas pancreáticos en comparación a los 7 días de tratamiento (figura 9).



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 11. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 2 después de 21 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes

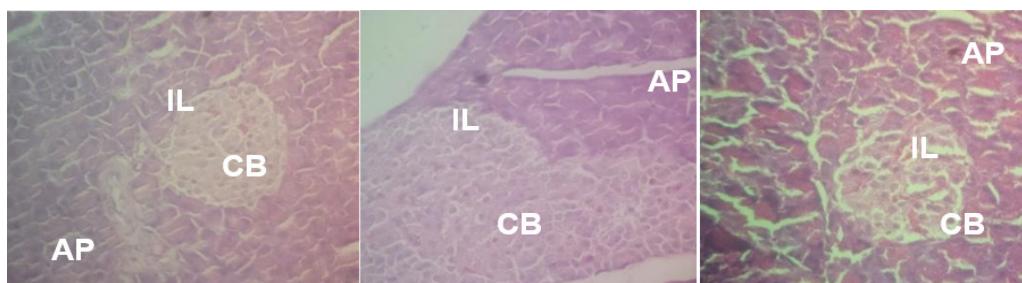
Los animales de experimentación tratados con la muestra 2 (agua alcalina) a los 21 días presentaron elementos inflamatorios, pero una conservación total de los islotes pancreáticos, células B pancreáticas, así como de la arquitectura de los acinos pancreáticos (figura 10).



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 12. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 3 después de 7, 14 y 21 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes respectivamente

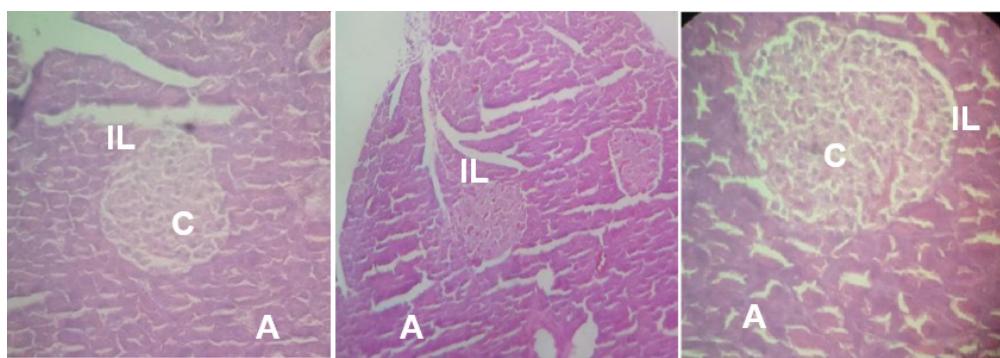
Los animales de experimentación tratados con la muestra 3(*Allium sativum* 250mg/Kg + Agua Alcalina 20ml/Kg) tuvieron ausencia total de elementos inflamatorios, así como una conservación total de los islotes pancreáticos, células B pancreáticas, así como de la arquitectura de los acinos pancreáticos desde el día 7 de tratamiento (figura 11).



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 13. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 4 después de 7, 14 y 21 días y 72 horas de Inducción de Diabetes respectivamente

Los animales de experimentación tratados con la muestra 4 (*Allium sativum* 500mg/Kg + Agua Alcalina 10ml/Kg) tuvieron ausencia total de elementos inflamatorios, así como una conservación total de los islotes pancreáticos, células B pancreáticas, así como de la arquitectura de los acinos pancreáticos desde el día 7 de tratamiento (figura 12).



Fuente: Chaca & Piguave

Figura 14. Apariencia Histológica del Páncreas Grupo Muestra 5 después de 7, 14 y 21 días de tratamiento y 72 horas de Inducción de Diabetes respectivamente

Los animales de experimentación tratados con la muestra 5 (*Allium sativum* 1000mg/Kg + Agua Alcalina 5ml/Kg) tuvieron ausencia total de elementos inflamatorios, así como una conservación total de los islotes pancreáticos, células B pancreáticas, así como de la arquitectura de los acinos pancreáticos desde el día 7 de tratamiento (figura 13).

DISCUSIÓN

De acuerdo a lo expuesto en los análisis histopatológicos la Glibenclamida no ejerció un efecto citoprotector, pero según los análisis de glucosa plasmática si logró regular los niveles de glucosa, esto se debe a que el mecanismo de acción de la Glibenclamida es estimular a las células B pancreáticas para la secreción de insulina.^(7,8)

En el caso del *Allium sativum*, esta al administrarse durante 7, 14 y 21 días impidió que los niveles de glucosa se elevaran luego de la inducción de diabetes.^(9,10) En los análisis histopatológicos de los grupos tratados con *Allium sativum*, se observó la conservación total del páncreas a partir de los 21 días de tratamiento, por lo que podríamos decir que el factor tiempo es importante para poder ejercer su efecto como citoprotector.^(11,12)

Este efecto normoglucemiante y citoprotector se debe a que el *Allium sativum* posee efecto antioxidante; ya que el *Allium sativum* inhibe la formación de radicales libres reforzando el mecanismo de captación de radicales endógenos, aumenta las enzimas antioxidantes celulares y protege las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación por los radicales libres.^(13,14)

Una investigación científica sobre el efecto protector del extracto de *Allium sativum* frente a la inducción de diabetes con aloxano en ratas, en las que se administró el extracto acuoso del mismo, durante 7 días antes de la inducción de diabetes con aloxano y 14 días después de la misma; concluyendo que el *Allium sativum* tuvo un efecto preventivo sobre el aloxano, ya que previno la elevación de la glucosa en sangre.^(15,16)

Por otro lado, la administración de Agua Alcalina durante 7, 14 y 21 días también impidió que los niveles de glucosa se elevaran luego de la inducción de diabetes.⁽¹⁷⁾ De acuerdo al mecanismo de acción esto se debe que el agua alcalina cede electrones libres que hace que bloquen la oxidación del tejido sano por la acción de los radicales libres.^(18,19)

Sin embargo, debido a la presencia de elementos inflamatorios a los 21 días de tratamiento con agua alcalina, podemos decir que esta presentó un efecto citoprotector menor que el *Allium sativum*, pero al compararlo con los análisis de glucosa su efecto normoglucemiante es igual.⁽²⁰⁾

Los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos en otros estudios, por ejemplo un estudio del efecto del agua alcalina en la apoptosis y diabetes inducida con aloxano, tuvo como resultado que los ratones tratados con agua alcalina antes de inyectarles aloxano sufrieron una menor apoptosis en el páncreas; un menor incremento y posterior reducción de los niveles de glucosa en sangre;⁽²¹⁾ y una menor disminución y posterior aumento de la insulina;⁽²²⁾ concluyendo que el agua alcalina tiene un importante efecto en prevención de la apoptosis de células pancreáticas, así como un efecto positivo en la prevención y control de la enfermedad diabetes mellitus.^(23,24)

Del tratamiento que hemos propuesto (diferentes mezclas *Allium sativum* y Agua Alcalina) se obtuvo una función citoprotectora a los 7 días de tratamiento en todas las mezclas propuestas, lo que se obtuvo a los 21 días de tratamiento solo con *Allium sativum* y no se obtuvo ni a los 21 días de tratamiento con agua alcalina solo, lo que sugiere que si existe un sinergismo entre el *Allium sativum* y el Agua Alcalina para ejercer un efecto citoprotector en menor tiempo.

CONCLUSIONES

De los resultados analizados se puede inferir que tanto el *Allium sativum*, Agua Alcalina administradas por separado, así como las mezclas de *Allium sativum* y Agua Alcalina, presentaron un efecto normoglucemiante a

partir de los 7 días de tratamiento, manteniendo esta tendencia hasta el final de la experimentación, en las que de acuerdo al análisis estadístico no presentaron diferencia significativa entre grupos.

Según el análisis histopatológico realizado, se demostró que a los 21 días el *Allium sativum* presentó un mejor efecto citoprotector; en cambio con el Agua Alcalina no se pudo evidenciar protección celular durante el tiempo que duró la experimentación; por otro lado las mezclas de *Allium sativum* y Agua Alcalina propuestas en diferentes dosis tuvieron un efecto citoprotector sobre el páncreas a partir del séptimo día de tratamiento. Por lo que se puede concluir que la administración de las mezclas presenta mayor eficacia en relación al tiempo de tratamiento al ser comparados con los que tuvieron la administración independiente de *Allium sativum* y Agua Alcalina.

Al comparar los resultados histopatológicos de las células β pancreáticas encontradas en los diferentes animales de experimentación sometidos al estudio, se evidenció que: el aloxano provoca una pancreatitis severa, la Glibenclamida no posee un efecto citoprotector alguno; el *Allium sativum* posee un efecto citoprotector que depende del tiempo de tratamiento, cumpliendo este efecto a partir del séptimo día de tratamiento; el Agua Alcalina tiene un efecto citoprotector mínimo que empieza a denotarse a los 21 días de tratamiento; y, todas las mezclas de *Allium sativum* y Agua Alcalina presentaron un sinergismo, ejerciendo su efecto citoprotector desde el séptimo día de tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alashkham FA, Osman MT, Adnan A, Bakar NS. Histopathological and Biochemical Effects of *Allium Sativum* Oil Administration on Type 1 Diabetic Rats. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2013;4(1):1045-53.
2. Alonso J. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Buenos Aires: Corpus; 2008.
3. Ankur R, Shahjad A. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *Int J Res Pharm Biomed Sci.* 2012;3:819-23.
4. AQUAGOLDEN. La Historia del Agua Alcalina [Internet]. 2013 Jul 24 [cited 2015 Jun 5]. Available from: <http://aquagoldens.weebly.com/agua-alcalina.html>
5. Ecogaia. Efectos Curativos del Agua Alcalina Ionizada [Internet]. 2010 Aug 9 [cited 2015 Aug 7]. Available from: <http://www.ecogaia.com/efectos-curativos-del-agua-alcalina-ionizada-1892.html>
6. Ecoportal. El agua que lo cura todo: alcalina y sin cloro [Internet]. 2014 Nov 19 [cited 2015 Jun 3]. Available from: <http://www.ecoportal.net/Eco-Noticias/El-agua-que-lo-cura-todo-alcalina-y-sin-cloro>
7. Federación Internacional de la Diabetes. ATLAS de la Diabetes de la FID. 6th ed. Federación Internacional de la Diabetes; 2013.
8. Henry M, Chambron J. Physico-Chemical, Biological and Therapeutic Characteristics of Electrolyzed Reduced Alkaline Water (ERAW). *Water J.* 2013;5:2094-115.
9. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Anuario de Estadísticas Hospitalarias Camas y Egresos 2014 [Internet]. 2015 Jul 24 [cited 2015 Jan 22]. Available from: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>
10. Jin D, Ryu SH, Kim HW, Yang EJ, Lim SJ, Ryang YS, et al. Anti-Diabetic Effect of Alkaline-Reduced Water on OLETF Rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(1):31-7.
11. Kim MJ, Jung KH, Uhm YK, Leem KH, Kim HK. Preservative Effect of Electrolyzed Reduced Water on Pancreatic β -Cell Mass in Diabetic db/db Mice. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(2):234-6.
12. Li Y, Hamasaki T, Teruya K, Nakamichi N, Gadek Z, Kashiwagi T, et al. Suppressive effects of natural reduced waters on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus. *Int J Cell Cult Biotechnol.* 2012;281-97.
13. Luengo TL. El ajo [Internet]. Revista Offarm. 2007 Jan 1 [cited 2015 Jul 23]. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-ajo-13097334>
14. Mokni M, Hamlaoui S, Limam F, Amri M, Aouani E. Acute modulation of rat plasma glucose by an aqueous garlic extract. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2013;7(30):2167-72.

15. Ojo RJ, Memedu AE, Akintayo CO, Akpan IS. Preventive Effect of Allium sativum on Alloxan Induced Diabetic Rat. ARPN J Agric Biol Sci. 2012;7(8):609-12.
16. Organización Mundial de la Salud. OMS Diabetes [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Jan 21]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
17. Oyebadejo S, Bassey EO, Malachy J. Antagonistic Salubrious Effects of Macerated Allium Sativum. Int J Pharm Res Allied Sci. 2013;2(3):50-7.
18. Shakya VK, Saxena RC, Anita S. Effect of ethanolic extract of Allium sativum bulbs on Streptozotocin induced diabetic rats. J Chem Pharm Res. 2010;2(6):171-5.
19. Shitahata S, Hamasaki T, Teruya K. Advanced research on the health benefit of reduced water. Trends Food Sci Technol. 2012;23:124-31.
20. Sociedad Española de Fitoterapia. Revista de Fitoterapia [Internet]. 2007 Nov 6 [cited 2015 Feb 8]. Available from: <http://www.fitoterapia.net/revista/pdf/RDF7-2%20all.pdf>
21. Tripathi P, Gupta PP, Lal VK. Effect of Co-administration of Allium sativum extract and Metformin on Blood glucose of Streptozotocin induced diabetic rats. J Intercult Ethnopharmacol. 2013;2(2):81-4.
22. Vidal Vademecum Spain. Principios Activos: Glibenclamida [Internet]. 2011 Sep 2 [cited 2015 Oct 12]. Available from: <http://www.vademecum.es/principios-activos-glibenclamida-a10bb01>
23. Water for Health Ltd. Water for Health [Internet]. 2009 Mar 20 [cited 2015 May 25]. Available from: www.water-for-health.co.uk
24. Wiener Lab. Vademecum Documentos [Internet]. 2000. Available from: http://www.wienerlab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/glicemia_enzimatica_sp.pdf.

FINANCIACIÓN

Ninguna.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Conceptualización: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Curación de datos: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Análisis formal: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Investigación: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Metodología: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Administración del proyecto: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Recursos: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Software: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia

Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Supervisión: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Validación: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Visualización: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Redacción - borrador original: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.

Redacción - revisión y edición: Alexandra López Barrera, Alondra Idrovo Encalada, Zoraida Burbano Gómez, Francisca Patricia Jimenez Granizo, Pilar Asunción Soledispa Cañarte, Glenda Marcela Sarmiento Tomalá, Francisca Patricia Jimenez Granizo.